

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2005 年 8 月 4 日 (04.08.2005)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2005/071413 A1

(51) 国際特許分類: G01N 33/543, 33/53  
(21) 国際出願番号: PCT/JP2005/001090  
(22) 国際出願日: 2005 年 1 月 27 日 (27.01.2005)  
(25) 国際出願の言語: 日本語  
(26) 国際公開の言語: 日本語  
(30) 優先権データ:  
特願2004-018886 2004 年 1 月 27 日 (27.01.2004) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): デンカ生研株式会社 (DENKA SEIKEN CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1030025 東京都中央区日本橋茅場町三丁目 4 番 2 号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 滝沢 和幸 (TAK-IZAWA, Kazuyuki) [JP/JP]; 〒9591695 新潟県五泉市南本町一丁目 2 番 2 号 デンカ生研株式会社内 Niigata (JP). 志田 亮 (SHIDA, Ryo) [JP/JP]; 〒9591695 新潟県五泉市南本町一丁目 2 番 2 号 デンカ生研株式会社内 Niigata (JP).

(74) 代理人: 平木 祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒1050001 東京都港区虎ノ門 4 丁目 3 番 2 0 号 神谷町 M T ビル 1 9 階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: CONVENIENT DETECTION METHOD, DETECTION APPARATUS AND DETECTION KIT

(54) 発明の名称: 簡便な検出法、検出装置及び検出キット

(57) Abstract: A convenient detection method excelling in sensitivity and specificity that in the treating step of an analyte containing an analytical subject, such as impurity removal, is capable of efficient reaction of a labeling reagent with the analytical subject so as to achieve rapid detection; a relevant detection apparatus; and a relevant detection kit. There is provided a method of detecting an analytical subject from an analyte, comprising the step of bringing a labeling reagent, the labeling reagent containing a ligand capable of specific binding to the analytical subject, into contact with the analyte and the step of feeding the analyte/labeling reagent mixture to a solid-phase support having, immobilized thereon, a capture reagent capable of specific binding to the analytical subject, wherein the step of bringing the labeling reagent into contact with the analyte is carried out outside the region of the solid-phase support and site in contact with the region of the solid-phase support. Further, there is provided a detection apparatus comprising a solid-phase support having, immobilized thereon, a capture reagent capable of specific binding to an analytical subject contained in an analyte; and provided a kit for detecting an analytical subject from an analyte, comprising a device for addition of an analyte containing a labeling reagent containing a ligand capable of specific binding to an analytical subject.

(57) 要約: 不純物除去等の被分析物質を含む検体の処理過程において効率良く標識試薬と被分析物質とを反応させることにより迅速に検出できる、簡便且つ感度・特異性に優れた検出法、検出装置及び検出キットの提供。検体中の被分析物質を検出する方法であって、被分析物質に特異的に結合するリガンドを含む標識試薬と検体とを接触させる工程および検体と標識試薬との混合物を、前記被分析物質に特異的に結合する捕捉試薬を固定化した固相支持体へ供給する工程を含み、検体と標識試薬を接触させる工程が、前記固相支持体部および前記固相支持体部と接触している部位以外で行われる、前記被分析物質を検出する方法、ならびに検体中の被分析物質に特異的に結合する捕捉試薬を固定化した固相支持体を含む検出装置及び被分析物質に特異的に結合するリガンドを含む標識試薬を含む検体添加用デバイスを含む、検体中の被分析物質検出用キット。

WO 2005/071413 A1

## 明 細 書

簡便な検出法、検出装置及び検出キット

### 技術分野

[0001] 本発明は、検体試料中の被分析物質を特異的に定性または定量測定する検出法、検出装置及び検出キットとその製法に関するものである。

### 背景技術

[0002] 免疫反応の特異性を利用して試料中の分析対象物を検出又は定量する分析方法として免疫拡散法、酵素測定法、凝集法等種々の方法論が実用化されている。特に近年、フロースルー式検査(検出)法(“Guide to Diagnostic Rapid Test Device Components”, 2<sup>nd</sup> edition, published by Scheicher & Schuell company, January 2000, Edited by Lisa Vickers, p6-8、及び特公平7-34016号公報)やイムノクロマトグラフィー式検査(検出)法(ラテラルフロー式、タンジェンシャルフロー式、特公平7-13640号公報、特許第2890384号公報)による検査法はその簡便性から急速に普及している。以下にこれらの検査法の原理を簡単に説明する。市販されている多くのフロースルー式検査法は、まず被分析物質(例:抗原)を捕捉するための捕捉試薬(例:抗体)を固定化したメンブレン(固相支持体)上に、被分析物質を含む検体を検体浮遊液に浮遊させた試料を所定量供すると、試料がメンブレンを通過する際に存在する被分析物質がメンブレンに固定化された捕捉試薬に捕捉され、被分析物質-捕捉試薬複合体を形成する。次に被分析物質に特異的に結合するリガンドを含む標識試薬(例:被分析物質に対する酵素標識)を所定量供すると、捕捉試薬-被分析物質-標識試薬の複合体が捕捉試薬固定化位置に形成される。そして、前記標識試薬を任意の方法(酵素標識の場合、基質を加えて発色反応を起こす)で検出することで、被分析物質の存在を判定することができる。

[0003] また、市販されている多くのイムノクロマトグラフィー検査法は、ストリップ状のメンブレンを有し、メンブレン上の長さ方向の一端に被分析物質(例:抗原)を捕捉するための捕捉試薬(例:抗体)を固定化し、逆の一端に被分析物質に特異的に結合するリガンドを含む標識試薬(例:可視可能な金コロイド粒子)をメンブレン上において展開可

能に保持して構成されている。被分析物質を含む検体を検体浮遊液に浮遊させた試料を標識試薬を保持した側のメンブレン上に所定量供すると、試料がメンブレンを展開する際、存在する被分析物質が標識試薬と結合し被分析物質-標識試薬の複合体が形成される。被分析物質-標識試薬複合体はそのままメンブレン上を展開して流動し、メンブレン上に固定化された捕捉試薬に捕捉されると捕捉試薬-被分析物質-標識試薬の複合体が捕捉試薬固定化位置に形成される。そして、標識試薬を任意の方法(可視可能な金コロイド粒子の場合、その凝集像)で検出することで、被分析物質の存在を判定することができる。

- [0004] 多くの検査の場合、被分析物質を含む検体には不純物が多く、それを除去するために様々な化学的・物理的处理が施される。その処理工程を施した試料から被分析物質をできるだけ不純物を除いた状態で抽出して捕捉試薬-被分析物質-標識試薬の複合体が形成することが、感度及び特異性の高いアッセイには必須条件ではあるが、その工程には多くの手順と時間がかかり、作業上の効率を悪化させる原因となる。また、多くの手順をかけることは作業上のミスを起こす要因になる場合が多く、安全性・コスト面及び結果的に作業上の効率を悪化させる原因となる。

特許文献1:特公平7-34016号公報

特許文献2:特公平7-13640号公報

特許文献3:特許第2890384号公報

非特許文献1:“Guide to Diagnostic Rapid Test Device Components”, 2nd edition, published by Scheicher & Schuell company, January 2000, Edited by Lisa Vickers, p6-8

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0005] 本発明は、不純物除去等の被分析物質を含む検体の処理過程において効率良く標識試薬と被分析物質とを反応させることにより迅速に検出できる、簡便且つ感度・特異性に優れた検出法、検出装置及び検出キットを提供するものである。

課題を解決するための手段

- [0006] 本発明者等は、被分析物質を含む検体から効率的かつ確実に不純物を除去し、さ

らにより効率的に捕捉試薬－被分析物質－標識試薬の複合体を形成させる迅速かつ高感度に被分析物質を検出し得る検出方法を開発すべく鋭意検討を行った。その結果、被分析物質と被分析物質に特異的に結合するリガンドを含む標識試薬を捕捉試薬が固定化された固相支持体上に添加する前に予め接触させ、その後フィルターを用いた濾過等により不純物を除去し、捕捉試薬を固定化した固相支持体に添加することにより、不純物の干渉を受けず、なおかつ効率的に捕捉試薬－被分析物質－標識試薬の複合体が形成されることを見出し、本発明を完成させるに至った。

[0007] 本発明の要旨を説明する。

- [0008] [1] 検体中の被分析物質を検出する方法であって、被分析物質に特異的に結合するリガンドを含む標識試薬と検体とを接触させる工程および検体と標識試薬との混合物を、前記被分析物質に特異的に結合する捕捉試薬を固定化した固相支持体に供給する工程を含み、検体と標識試薬を接触させる工程が、前記固相支持体と分離した部位で行われる、前記被分析物質を検出する方法、
- [2] 被分析物質に特異的に結合するリガンドを含む標識試薬と検体とを接触させる工程および被分析物質と標識試薬との混合物を、前記被分析物質に特異的に結合する捕捉試薬を固定化した固相支持体に供給する工程が一工程で行われることを特徴とする、[1]の被分析物質を検出する方法、
- [3] さらに、不純物を除去する濾過工程を含み、被分析物質に特異的に結合するリガンドを含む標識試薬と検体とを接触させる工程、不純物を除去する濾過工程および被分析物質と標識試薬との混合物を、前記被分析物質に特異的に結合する捕捉試薬を固定化した固相支持体に供給する工程が一工程で行われることを特徴とする、[2]の被分析物質を検出する方法、
- [4] フロースルー式検出法である、[1]から[3]のいずれかの方法、
- [5] イムノクロマトグラフィー式検出法である、[1]から[3]のいずれかの方法、
- [6] 被分析物質に特異的に結合するリガンドを含む標識試薬と検体との接触が、標識試薬を含む検体添加用デバイス中で行われる、[1]から[5]のいずれかの方法、
- [7] 検体添加用デバイス中に濾過手段が含まれる[6]の方法、
- [8] 標識試薬が濾過手段中に含まれる[7]の方法、

- [9] 被分析物質に特異的に結合するリガンドを含む標識試薬を含む多孔質材料が、捕捉試薬を固定化した固相支持体の上層に設置し得るアダプター中に含まれており、検体をアダプター中に添加することにより、被分析物質に特異的に結合するリガンドを含む標識試薬と検体とを接触させ、次いで検体と標識試薬との混合物を、前記被分析物質に特異的に結合する捕捉試薬を固定化した固相支持体に供給することを含む、フロースルー式検出法である[1]の方法、
- [10] 標識試薬が不溶性粒状物質、酵素、蛍光色素および放射性同位体からなる群から選択される物質で標識されている[1]から[9]のいずれかの方法、
- [11] 標識試薬が酵素で標識されており、さらに該酵素の基質を供給する工程を含む[10]の方法、
- [12] 被分析物質が抗原であり、かつリガンド及び捕捉試薬が前記抗原に特異的に結合する抗体である、[1]から[11]のいずれかの方法、
- [13] 被分析物質が抗体であり、かつリガンド及び捕捉試薬が前記抗体が特異的に結合する抗原である、[1]から[11]のいずれかの方法、
- [14] 固相支持体が、ニトロセルロース、酢酸セルロース、ナイロン、ポリエーテルスルホン、ポリビニルアルコール、ポリエステル、ガラス繊維、ポリオレフィン、セルロース、およびこれらの混合繊維からなる人工ポリマーからなる群から選択される[1]から[13]のいずれかの方法、
- [15] 検体中の被分析物質に特異的に結合する捕捉試薬を固定化した固相支持体を含む検出装置及び被分析物質に特異的に結合するリガンドを含む標識試薬を含む検体添加用デバイスを含む、検体中の被分析物質検出用キット、
- [16] さらに、被分析物質に特異的に結合するリガンドを含む標識試薬を含む検体添加用デバイス中で接触した検体と標識試薬との混合物を濾過する手段を含む[15]のキット、
- [17] 検体添加用デバイスが、濾過手段を含む[16]のキット、
- [18] 濾過手段が、標識試薬を含む[17]のキット、
- [19] フロースルー式検出キットである、[15]から[18]のいずれかのキット、
- [20] イムノクロマトグラフィー式検出キットである、[15]から[18]のいずれかのキット、

[21] 標識試薬が不溶性粒状物質、酵素、蛍光色素および放射性同位体からなる群から選択される物質で標識されている[15]から[20]のいずれかのキット、

[22] 標識試薬が酵素であり、さらに該酵素の基質を供給する手段を含む[21]のキット、

[23] 被分析物質が抗原であり、かつリガンド及び捕捉試薬が前記抗原に特異的に結合する抗体である、[15]から[22]のいずれかのキット、

[24] 被分析物質が抗体であり、かつリガンド及び捕捉試薬が前記抗体が特異的に結合する抗原である、[15]から[22]のいずれかのキット、

[25] 固相支持体が、ニトロセルロース、酢酸セルロース、ナイロン、ポリエーテルスルホン、ポリビニルアルコール、ポリエステル、ガラス繊維、ポリオレフィン、セルロース、およびこれらの混合繊維からなる人工ポリマーからなる群から選択される[15]から[24]のいずれかのキット、

[26] 検体中の被分析物質に特異的に結合する捕捉試薬を固定化した固相支持体および被分析物質に特異的に結合するリガンドを含む標識試薬を含む多孔質材料を含むフロースルー式検出装置であって、前記多孔質材料が前記固相支持体の上層に位置するアダプター中に含まれる被分析物質検出装置、

[27] 標識試薬が不溶性粒状物質、酵素、蛍光色素および放射性同位体からなる群から選択される物質で標識されている[26]の被分析物質検出装置、

[28] 被分析物質が抗原であり、かつリガンド及び捕捉試薬が前記抗原に特異的に結合する抗体である、[26]または[27]の被分析物質検出装置、

[29] 被分析物質が抗体であり、かつリガンド及び捕捉試薬が前記抗体が特異的に結合する抗原である、[26]または[27]の被分析物質検出装置、

[30] 固相支持体が、ニトロセルロース、酢酸セルロース、ナイロン、ポリエーテルスルホン、ポリビニルアルコール、ポリエステル、ガラス繊維、ポリオレフィン、セルロース、およびこれらの混合繊維からなる人工ポリマーからなる群から選択される[26]から[29]のいずれかの被分析物質検出装置、

[31] 検体を収納する容器部分および検体を検体中の被分析物質検出装置に供給するためのノズル部分を含む、検体中の被分析物の検出に用いられる検体添加用

デバイスであって、ノズル部分に検体濾過手段および検体中の被分析物質と複合体を形成し得る標識試薬が組み込まれた、検体添加用デバイス、

[32] 標識試薬が不溶性粒状物質、酵素、蛍光色素および放射性同位体からなる群から選択される物質で標識されている[31]の検体添加用デバイス、  
ならびに

[33] 検体濾過手段がフィルターである[31]または[32]の検体添加用デバイス。

[0009] 本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願2004-018886号の明細書および/または図面に記載される内容を包含する。

### 発明の効果

[0010] 本発明の方法は、固相支持体に固定化した捕捉試薬、検体中の被検出物質および標識試薬の複合体を形成させる検体中の被分析物質を検出する方法において、あらかじめ被分析物質に特異的に結合するリガンドを含む標識試薬と検体とを接触させるので、被分析物質と標識物質の接触時間を制御することができ、高感度に被分析物質を検出することができる。また、接触させ得られた被分析物質と標識物質の混合物を検出装置に添加するだけで検出を行うことができるので、迅速に被分析物質を検出することができる。さらに、被分析物質と標識物質の混合物の添加と同時に該混合物を濾過することにより、検体中の不純物を除去することができる。

[0011] 本発明の方法によれば、検体と被分析物質に特異的に結合するリガンドを含む標識試薬とを接触させる工程、不純物を除去する濾過工程および被分析物質と標識試薬との混合物を、前記被分析物質に特異的に結合する捕捉試薬を固定化した固相支持体に供給する工程を一工程で行うことができ、迅速かつ高感度に被分析物質を検出することができる。

[0012] また、本発明の方法は、標識試薬および濾過手段の両方を含む検体添加用デバイスを用いることにより、該デバイスを用いて被分析物質に特異的に結合するリガンドを含む標識試薬と検体とを接触させる工程、不純物を除去する濾過工程および被分析物質と標識試薬との混合物を、前記被分析物質に特異的に結合する捕捉試薬を固定化した固相支持体に供給する工程を一工程で容易に行うことができる。また、該デバイス中で検体と被分析物質との接触時間を制御することができ、感度を調節す

ることができる。

- [0013] 本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願2004-018886号の明細書および／または図面に記載される内容を包含する。

### 図面の簡単な説明

- [0014] [図1]本発明の検出装置の一例(標識物質:不溶性粒状物質)を示す図である。  
[図2]本発明の検出装置の一例(標識物質:酵素)を示す図である。  
[図3A]本発明の濾過手段および標識試薬を含む検体添加用デバイスを示す図である。  
[図3B]本発明の濾過手段および標識試薬を含む検体添加用デバイスを示す図である。  
[図3C]本発明の濾過手段および標識試薬を含む検体添加用デバイスを示す図である。  
[図3D]本発明の濾過手段および標識試薬を含む検体添加用デバイスを示す図である。  
[図3E]本発明の濾過手段および標識試薬を含む検体添加用デバイスを示す図である。  
[図4A]本発明のフロースルー式検出装置を示す図であり、ハウジングを含むフロースルー式検出装置を示す図である。  
[図4B]本発明のフロースルー式検出装置を示す図であり、標識試薬を含むアダプターを示す図である。  
[図4C]本発明のフロースルー式検出装置を示す図であり、標識試薬を検体添加用デバイスに組み込んだ検出装置を示す図である。  
[図4D]本発明のフロースルー式検出装置を示す図であり、標識試薬を含むアダプターの俯瞰図を示す図である。  
[図4E]本発明のフロースルー式検出装置を示す図であり、標識試薬を含むアダプターの俯瞰図を示す図である。

### 符号の説明

- [0015] 1 標識試薬



- 2 検体添加用デバイス
- 3 試料滴下部(サンプルパッド)
- 4 捕捉試薬(キャプチャー抗体)
- 5 対照部位(コントロール部位)
- 6 固相支持体(ニトロセルロース膜)
- 7 吸収部位(アブソーベントパッド)
- 8 トップラミネートまたはハウジング
- 9 試料滴下部(サンプルパッド)
- 10 乾燥基質
- 11 ノズル
- 12 ノズル部位
- 13 フィルター
- 14 標識試薬
- 15 検体収容容器部位
- 16 検体試料と標識試薬が一時的に貯留し混合される空間
- 17 空気抜き穴
- 18 ハウジング
- 19 固相支持体
- 20 スペーサー
- 21 吸収部位
- 22 検体試料
- 23 標識試薬
- 24 アダプター
- 25 開口部
- 26 捕捉試薬塗布領域

発明を実施するための最良の形態

[0016] 以下、本発明について詳細に説明する。

[0017] 本発明は、検体中の被分析物質を検出する方法であって、フロースルー式検出方

法およびイムノクロマトグラフィー式検出方法を含む。フロースルー式検出方法およびイムノクロマトグラフィー式検出方法はいずれも、少なくとも被分析物質を結合捕捉し得る捕捉物質を固定化した膜状の固相支持体を含む。フロースルー式検出方法においては、検体試料が前記固相支持体を横切るように通過し、イムノクロマトグラフィー式検出法においては、固相支持体に沿って展開移動する。

[0018] 本発明の方法においてはまず、被分析物質の定性及び定量分析を行う目的の検体をその被分析物質と被分析物質に特異的に結合するリガンドを含む標識試薬が特異的結合反応を起こしやすい状態に処理をする。処理方法は酸・塩基等各種化学薬品等を用いた化学的処理方法でも良いし、加熱・攪拌・超音波等を用いた物理的処理方法のどちらでも構わず、またその両方法を用いても良い。具体的には被分析物質は検体中において、微生物や細胞などの生体由来マトリックスに存在する場合が多いので、検体を酸溶液、塩基溶液、界面活性剤溶液、変性剤溶液または緩衝液に浮遊し、攪拌または加熱によって微生物及び細胞マトリックスを破壊して、被分析物質を抽出する。次に浮遊液を被分析物質と被分析物質に特異的に結合するリガンドを含む標識試薬が特異的結合反応を生じやすいようpHを調節したり、あるいは無機塩類の添加濃度を調整したり、特異反応を増強する界面活性剤や高分子ポリマー、塩基性化合物等の添加剤や非特異反応を軽減する界面活性剤や高分子ポリマー、塩基性化合物等の添加剤を加える。本発明の検出装置において、検体を処理する処理液として、例えば特開2003-279577号公報に記載の検体浮遊液組成物が挙げられる。もし被分析物質が検体中において、被分析物質に特異的に結合するリガンドを含む標識試薬と特異的結合反応を起こしやすい状態であれば、検体を特異的結合反応を生じやすい浮遊液に浮遊するのみでも構わないし、検体をそのまま使用しても差し支えはない。この一連の検体処理は検体添加用デバイスで行うと、操作がより簡便となる。

[0019] 本発明の方法において分析しようとする被分析物質は、限定されないが通常は抗原または抗体である。検体も限定されず、全血、血清、血漿、尿、唾液、喀痰、汗または鼻、咽頭、鼻咽頭もしくは呼吸性の分泌物等の生体試料の他、肉、植物等の食物の抽出物等が含まれる。被分析物質に結合するリガンドは、典型的には被分析物質

が抗原の場合は、該抗原に特異的に結合する抗体、被分析物質が抗体の場合は該抗体が特異的に結合する抗原であり、その他、被分析物質-リガンドの組合わせとして、受容体-リガンド、リガンド-受容体等の組合わせが挙げられる。標識試薬とは、前記リガンドと適当な標識物質を結合させたコンジュゲートであり、標識物質として、金コロイド等の金属コロイド、セレンウムコロイド等の非金属コロイド、着色樹脂粒子、染料コロイド及び着色リポソーム等の不溶性粒状物質やアルカリフォスファターゼ、ペルオキシダーゼ等の発色反応を触媒する酵素、蛍光色素、放射性同位体等が挙げられる。

[0020] 次に上述の方法で処理された検体試料を捕捉試薬を固定化した固相支持体上に供する前に前記標識試薬と接触させ混合することにより、前記標識試薬-前記被分析物質の複合体を形成させる。図1にイムノクロマトグラフィー式検出装置を用いた場合の本発明の方法の概要を示す。フロースルー式検出装置の場合は、図1のイムノクロマトグラフィー検出装置部分をフロースルー式検出装置に代えればよい。検体中に被分析物質が含まれる場合、検体と標識試薬を接触させることにより、検体と標識試薬が混合し混合物ができる。検体と標識試薬の混合物は、被分析物質と標識試薬の混合物を含み、さらに被分析物質と標識試薬の複合体を含む。試料は被分析物質と被分析物質に特異的に結合するリガンドが特異的結合反応を起こしやすいよう上述の方法で処理してあり、また前記標識試薬は前記被分析物質に対して過剰量を接触させるので、前記被分析物質の多くは前記標識試薬のみと効率的に前記複合体を形成する。ここで、捕捉試薬とは被分析物質と特異的に結合する物質であり、捕捉試薬-被分析物質の関係は、前述の被分析物質-標識試薬との関係と同様に、抗原-抗体、抗体-抗原、受容体-リガンド、リガンド-受容体等であり得る。捕捉試薬と標識試薬は同じ物質でもよいが、被分析物質中に該物質と結合する部位が一つしか存在しない場合は、標識試薬-被分析物質-捕捉試薬複合体が形成されない。従って、この場合捕捉試薬と標識試薬はそれぞれ被分析物質の異なる部位に結合する必要がある。固相支持体は毛管現象により試料検体が吸収され流動し得るものであれば、どのようなものであってもよい。例えば、支持体はニトロセルロース、酢酸セルロース、ナイロン、ポリエーテルスルホン、ポリビニルアルコール、ポリエステル、ガラス繊

維、ポリオレフィン、セルロース、これらの混合繊維からなる人工ポリマーからなる群から選択される。固相支持体は本発明の方法がフロースルー式検出法である場合は、任意の大きさの膜状の支持体であり、膜に捕捉試薬が固定化され、膜上に捕捉試薬領域が設定される。本発明の方法がイムノクロマトグラフィー式検出法の場合は、好ましくは短冊状のストリップの形状を有する。前記捕捉試薬の固相支持体への固定化は、吸着による方法、アミノ基、カルボキシル基等の官能基を利用して化学的に結合させる方法等、公知の方法で行えばよい。

[0021] 次に前記被分析物質に特異的に結合する捕捉試薬を固定化した固相支持体上に前記標識試薬-前記被分析物質の複合体を含む検体と標識試薬の混合試料を供して、標識試薬-被分析物質-捕捉試薬複合体を形成させる。この際、フロースルー式検出法においては、標識試薬-前記被分析物質の複合体は、捕捉試薬が固定化された固相支持体を通過する際に捕捉試薬に捕捉され、標識試薬-被分析物質-捕捉試薬複合体が形成される。また、イムノクロマトグラフィー式検出法においては、捕捉試薬が固定化された固相支持体上を移動する際に捕捉試薬に捕捉され、標識試薬-被分析物質-捕捉試薬複合体が形成される。固相支持体に捕捉された標識試薬の存否を検出することで被分析物質の存在を判定することができる。被分析物質と標識試薬が固相支持体と分離した部位で予め接触するよう構成してあるので、被分析物質と標識試薬が十分接触し複合体を形成している。そのため、試料を捕捉試薬を固定化した固相支持体に添加する動作を行うだけで標識試薬-被分析物質-捕捉試薬の複合体の形成を簡便且つ迅速に行うことができ、被分析物質の検出(アッセイ)を実施できる。

[0022] ここで、「被分析物質と標識試薬が固相支持体と分離した部位で予め接触する」とは、イムノクロマトグラフィー式検出装置においては、標識試薬が固相支持体に含まれておらず、または固相支持体と接触しており液体が固相支持体と連絡し得る部位、例えば、検体添加部位等にも含まれていないことをいう。この場合、被分析物質と標識試薬は、固相支持体および固相支持体と接触している部位以外で予め接触する。例えば、従来のイムノクロマトグラフィー式検出装置においては、固相支持体と標識試薬を含む多孔質支持体が接触する形で構成されているものがあり、該従来の装置

においては、標識試薬を含む多孔質支持体が検体添加部位を兼ね、該検体添加部位に検体を添加することにより、検体と標識試薬が接触し、検体と標識試薬の混合物は直ちに固相支持体に移動する。すなわち、この従来の装置においては、検体と標識試薬の接触は固相支持体と接触した部位で行われるのであり、固相支持体と分離した部位では行われない。本発明においては、検体と標識試薬の接触時間等を調節するために、この従来の装置とは異なり、検体と標識試薬の混合物を固相支持体および固相支持体と接触している部位以外の部位、すなわち固相支持体と分離した部位で接触する。

[0023] また、フロースルー式検出装置においては、固相支持体の上層に標識試薬を含むアダプターであって、固相支持体とは分離可能なアダプターがセットされており、該アダプター中に検体を添加することにより、アダプター中で検体と標識試薬が接触することをいう。該アダプターには、検体と標識試薬の混合物を固相支持体に供給するための1つまたは複数の開口部があり、検体と標識試薬の接触した後に、検体と標識試薬の混合物は、該開口部を通して固相支持体に供給される。実際には、アダプターの外側の一部と固相支持体は接触し得るが、検体と標識試薬の接触は、アダプター内部で起こるので、固相支持体と分離した部位で接触するといえる。また、図4Dおよび図4Eに標識試薬を含むアダプターの一例を示すが、この例では、標識試薬を含む多孔質材料とアダプターから固相支持体へ検体と標識試薬の混合物を供給する開口部が離れて存在している。検体と標識試薬との最初の接触は、標識試薬が存在する部位で起こるので、検体と標識試薬の接触は固相支持体と分離した部位で行われる。

[0024] 標識試薬と検体との接触は、検体添加用デバイス中で行ってもよい。検体添加用デバイスは、検出装置外の付属部品であり、採取した検体を入れ特定の処理を行うための容器である。該デバイスには、バイアル、シリンジ、チューブ等が含まれる。また、該デバイスは容器だけでなく、検体を検出装置に添加供給する際に検体を濾過するための濾過手段を含んでいてもよい。検体添加用デバイスは、検体を収容する容器部分と容器内の検体を検出装置に添加供給する部分を含む。後者の検体を添加供給する部分は、検体を容器内から排出するためのノズル(開口部)を有する部分

を有し、該部分は容器部分の蓋を兼ねることもできる。後者の検体を検出装置に添加供給する部分は、ノズル部分あるいは蓋部分ともいう。また、検体添加用デバイスが濾過手段を含む場合、後述のように検体添加用デバイスは濾過フィルターを含むフィルターハウジングからなるノズル部分と容器部分の2つの部品から構成されていてもよい。この場合のフィルターハウジングは、検体をフィルターに通す開口部とフィルターを通過した検体を排出する開口部を有し、両開口部の間にフィルターが存在する。容器は、例えば、検体をフィルターに圧力をかけて通すことができるシリンジ等を用いればよい。

[0025] 前記標識試薬は検体添加用デバイス組み込んでおいてもよい。ここで組込むとは、標識試薬を検体添加用デバイスのいずれかの部分に含ませ、検体添加用デバイスに検体を入れてから検体を検出装置に供給するまでの間に検体と標識試薬が接触し得るようにすることという。検体中の被分析物質が標識試薬組み込み位置に供されることによって被分析物質と前記標識試薬が接触し、試料を捕捉試薬に添加する操作を行うだけで標識試薬-被分析物質-捕捉試薬の複合体の形成を簡便且つ迅速に行うことが容易に実施できる。例えば、バイアル、シリンジおよびチューブ等の検体採取用容器に必要量の標識試薬を入れておいて、該容器に必要量の検体を添加して混合すればよい。標識試薬は、液体でも凍結乾燥させたものでもよく、またガラス繊維不織布等の適当な多孔質材料に吸収させ、乾燥させ、該多孔質材料を裁断した切片(標識試薬パッド)を入れておいてもよい。この場合、液体検体と該切片が接触し、切片中の標識試薬が検体中に溶解する。検出装置を長期間の保存に対応させるためには液状よりも乾燥状態での提供がより好ましい。標識試薬の乾燥体を作製するには凍結乾燥法では製造法がバッチ法となり特殊な大規模設備が必要となる。

[0026] 一方、温風乾燥法ではロール紙(ロール形状の支持体)に試薬噴霧後、ドライヤー型の温風送風機で乾燥することで連続製造が可能となる。標識試薬の形態は、目的により使い分けることが可能である。この際、検体中の不純物を除去するために、検体または検体と標識試薬の混合物を濾過することが望ましい。濾過は標識試薬-被分析物質の複合体を検出装置に添加する際に行えばよい。上記検体添加デバイスのノズル部分にフィルター等の濾過手段を含ませ、検体と標識試薬混合物をフィルタ

ーを通して添加すればよい。この際、フィルター中に標識試薬を組込んで含ませてもよい。例えば、フィルター自体に標識試薬を吸収させ乾燥させておいてもよいし、フィルターと前述の標識試薬を吸収させ乾燥させた多孔質材料の切片とを接触させてもよい。また、フィルターと標識試薬を含む多孔質材料とを、フィルター用ハウジングに組込んでよい。この際、フィルターと標識試薬を含む多孔質材料は接触していても、していなくてもよい。フィルターは、検体中に含まれる凝集物や固形物等の不純物を除去できるものならば限定されず、紙製のろ紙、ガラスフィルター、孔径 $2\mu\text{m}$ 以下（例えば、 $0.22\mu\text{m}$ 、 $0.45\mu\text{m}$ ）のメンブランフィルター等を用いることができる。また、検体試料として全血を用いる場合には、フィルターに赤血球を除去する機能を持たせてもよい。例えば、フィルターに抗赤血球抗体を含ませることにより赤血球を除去することが可能である。なお、全血を用いる場合、フィルターにより赤血球を除去した後に、検体と標識試薬が接触するのが望ましい。検体添加用デバイスとして、例えば図1に示した標識試薬を含む多孔質材料（コンジュゲートパッド）の入った容器や、後述する図3に示した濾過手段を含む容器が挙げられる。また、フロースルー式検出装置においては、図4Bに示した標識試薬を含む多孔質材料（コンジュゲートパッド）の入ったアダプターも含まれる。

[0027] 図3には濾過手段と標識試薬を含む検体添加用デバイスの例を示すが、本発明の検体添加デバイスは図1や図3に示したものには限定されず、検体を収容でき、検体を検出装置の検体添加部位に添加できるデバイスならばどのような形態のものも含まれる。図3の検体添加用デバイス中、下の部分が検体を収容する容器部分であり、上の部分が検体添加ノズルを有する容器の蓋部分（ノズル部分ともいう）であり、該蓋部分にフィルターをセットすることができる。図3Aは濾過手段である濾過フィルターと標識試薬を含ませた多孔質材料が接触せず分離しており、濾過フィルターよりも上流側に標識試薬を含ませた多孔質材料が存在する。この場合、標識試薬を含ませた多孔質材料は、デバイス内部、例えば容器部内部に適当な固定手段で固定しておいてもよいし、固定せず入れておいてもよい。ここで、上流とは検体添加デバイスを用いて検体を添加するときの該デバイスに収容した検体流体の流れに関しての上流をいい、デバイス中において検体添加ノズルからより離れた部分を上流といい、検体添加

ノズルに近い部分を下流という。図3Aのデバイスを用いるときは、デバイス中に検体を入れ、転倒混和して検体と標識試薬を接触混合する。その後、混合物をフィルターを通してデバイスのノズル部分から検出装置に添加すればよい。

[0028] 図3Bは、濾過フィルターと標識試薬を含ませた多孔質材料が接触して一体化しており、標識試薬を含ませた多孔質材料は、フィルターの上流側に設けられている。このデバイスにおいては、標識試薬を含ませた多孔質材料を1層または複数層のフィルターからなる濾過フィルターの1層として組込むことができる。図3Bに示すデバイスにおいては、検体を検出装置に添加する際に検体が標識試薬を含ませた多孔質材料を通過し、この際に含浸した標識試薬が検体中に溶解し、検体と標識試薬が接触混合される。該混合物はフィルターを通過して、ノズル部分から検出装置に添加される。図3Bのデバイスの場合、大容量の試料を滴下しないと多孔質材料から標識試薬が充分溶出されず、量が一定しなくなる(性能が安定しなくなる)という可能性がある、また、滴下後のデバイス側での吸収時間が早すぎると十分な検出感度が得られない可能性がある。従って、デバイスメンブレンに孔径の小さいものを選ぶか、あるいは適当なアダプターを用いる等により液体の流れる間口(流路の大きさ)を小さくし、検体が標識試薬、並びに捕捉試薬と接触する時間を長くすることが望ましい。

[0029] 図3Cは、濾過フィルターと標識試薬を含ませた多孔質材料が接触して一体化しており、標識試薬を含ませた多孔質材料は、フィルターの下流側に設けられている。図3Cに示すデバイスにおいては、検体を検出装置に添加すると、該検体はフィルターを通り、標識試薬を含ませた多孔質材料を通過し、この際に含浸した標識試薬が検体中に溶解し、検体と標識試薬が接触混合される。該混合物はフィルターを通過して、ノズルから検出装置に添加される。図3Cのデバイスの場合、図3Bのデバイスの場合と同じ理由で、デバイスメンブレンに孔径の小さいものを選ぶか、あるいは適当なアダプターを用いる等により液体の流れる間口(流路の大きさ)を小さくし、検体が標識試薬と接触する時間を長くすることが望ましい。

[0030] 図3Dは、濾過手段である濾過フィルターと標識試薬を含ませた多孔質材料が接触せず分離しており、濾過フィルターよりも下流側に標識試薬を含ませた多孔質材料が存在する。図3Dのデバイスにおいて、フィルターとノズルの間に適当な空間を設けそ



の空間内に標識試薬を含ませた多孔質材料を含ませればよい。検体を検出装置に添加する際に検体はフィルターを通り、標識試薬を含ませた多孔質材料が存在する空間で標識試薬と検体が接触混合される。検体は該空間内に一時的に貯留するため検体と標識試薬を含ませた多孔質材料の接触時間を長くすることができ、検体と標識試薬の十分な接触が達成される。なお、この際空間部分とデバイス外側とを連絡する空気孔を設けておくことが望ましい。このためには、図3Dに示すように、ノズル部分とフィルターを組込んだ部分を別体にすればよい。検体と標識試薬の混合物を検出装置に添加する際には、ノズル部分をフィルター組込み部分に押し付けられ、空気孔が塞がれると同時にノズルより検体が滴下される。このように、濾過手段に標識試薬を組込むことにより検体中の被分析物質と標識試薬との接触混合と濾過が一工程でほぼ同時に行うことができる。また、検体添加デバイスに標識試薬を組込んだ濾過手段を含ませることにより、検体中の被分析物質と標識試薬との接触混合、不純物の濾過、および検体と標識試薬の混合物の検出装置への添加が一工程でほぼ同時に行うことができる。ここで、「一工程で行うことができる」とは検体の添加という一つの操作で、検体中の被分析物質と標識試薬との接触混合と濾過、あるいは検体中の被分析物質と標識試薬との接触混合、不純物の濾過、および検体と標識試薬の混合物の検出装置への添加が連続的に行えるという意味であり、これらを同時に行うことは必要としない。なお、標識試薬は、使用するまでに外れないように組込んでおく必要がある。

[0031] 上述のように、本発明の検体添加用デバイスは、その設計により標識試薬と検体中の被分析物質の接触時間を調節し、検出装置に添加する検体と標識試薬混合物中の被分析物質-標識試薬複合体の濃度を調節することができる。例えば、図1や図3Aに示す方法においては、容器中における検体と標識試薬の接触時間を制御すればよく、また図4Cや図3BからEに示す検体添加用デバイスを用いる方法においては、検体を検出装置に供給する際の検体の流速を制御すればよい。さらに、図4Bに示す標識試薬を含むアダプターを用いるフロースルー式検出法の場合は、アダプターから検出装置に検体が移動するのにかかる時間を制御すればよい。このためには、例えば、アダプターから固相支持体に検体が移動する開口部の大きさを変えたり、

あるいは該開口部に適当なフィルターを設ければよい。該デバイスは、被分析物質と標識試薬の複合体を濃縮する機能を有している。この部品により、被分析物質が少量であっても感度・特異性に優れたアッセイを実施できる。

[0032] また検出装置の固相支持体と接触している検体添加部位にフィルターを設けておいてもよい。

[0033] さらに、検出装置がフロースルー式検出装置の場合、被分析物質に特異的に結合するリガンドを含む標識試薬を含む多孔質材料を、捕捉試薬を固定化した固相支持体の上層に設けてもよい。この際、標識試薬を含む多孔質材料を、捕捉試薬を固定化した固相支持体に接触しないように設けておくことが望ましい。図4に本発明のフロースルー式検出装置の例を示す。フロースルー式検出装置は、捕捉試薬を固定化した固相支持体、吸収部分(吸収体)、スパーサー等が層状に重ねられ、該多層が適当なハウジング内に収められる。図4Aがハウジングを有するフロースルー式検出装置を示す。標識試薬を含む多孔質材料は該ハウジングに結合させることができる容器状のアダプター内に含ませればよい。該アダプターに検体を添加することにより、アダプター内で標識試薬を含む多孔質材料と検体が接触混合し、検体中の被分析物質と標識試薬が複合体を形成し、該複合体は次いで、アダプター下部に設けた開口部より下層の捕捉試薬を固定化した支持体に移動し、固定化された捕捉試薬に捕捉され、複合体を形成する。複合体が形成された場合、標識試薬の凝集像として認識される。この際、アダプターと捕捉試薬を固定化した支持体は接触してても接触しなくてもよい。また、図4Aにおいては、ハウジングと固相支持体等は離れているが、ハウジング内に固相支持体等を固定するために、ハウジングと固相支持体等を接触させてもよい。図4DおよびEは、アダプターの一例を俯瞰した図である。アダプターの形状は、該図に示したものに限定されないが、該図に示したアダプターの例においては、菱形および円型の開口部がある。該アダプターを用いる装置においては、固相支持体にアダプターの開口部に対応するように、被分析物質に特異的に結合するリガンドあるいは対照試薬を、開口部と同大同形になるように固定化すればよい。図4DおよびEに示す装置においては、菱形の開口部と円形の開口部があり、該開口部に対応する固相支持体部分に、リガンドと対照試薬が固定化される。

- [0034] また、アダプターに標識試薬を含ませる場合は、標識試薬が検出装置の検体を供給する領域を遮らないように、すなわちアダプターの開口部を塞がないように含ませる必要がある。図4Dにおいては、開口部の周囲に標識試薬が存在し、図4Eにおいては、2つの開口部の間に標識試薬が存在する。該図は一例であり、要は検体と標識試薬の混合物が固相支持体に供給されるのを妨げないように含ませればよい。図4Dおよび図4Eの場合、具体的には標識試薬を含む多孔質材料を図4Dおよび図4Eに示すような位置に適当な固定手段で固定すればよい。固定手段は限定されないが、例えばアダプター下部内面に前記多孔質材料が収まるような凹部を設けてもよし、検出に影響を与えない接着剤で前記多孔質をアダプター内部に貼りつけてもよい。また、このようにすることにより、アダプターを取り外すことなく、凝集像を観察することができる。
- [0035] また、標識試薬が酵素である場合は、標識試薬-被分析物質の複合体を添加した後に、固相支持体に酵素の基質を添加すればよい。基質の添加は、基質溶液を装置に滴下して行ってもよいし、予め装置に、基質を組込んだ基質供給手段を設けておいてもよい。後者の場合、例えばイムノクロマトグラフィー式検出装置の試料添加部位の上流に基質溶液を吸収させ乾燥させたガラス繊維やポリスチレンでできた不織布等の多孔質材料を設けておき、検体を添加した後に、該基質を組込んだ部位に水、緩衝液等の適当な展開溶液を滴下すればよい。これらの操作により基質が展開され標識試薬-被分析物質-捕捉試薬複合体が形成された部位に到達し、標識試薬の酵素の作用により、発色する。図2に標識物質として酵素を用いた場合のイムノクロマトグラフィー式検出装置を用いた検出法の概要を示す。フロースルー式検出装置の場合においては、例えば基質溶液を吸収させ乾燥させたガラス繊維やポリスチレンでできた不織布等の多孔質材料を別途準備しておいて、被分析物質と標識試薬の混合物を検出装置に添加した後に、基質溶液を含む多孔質材料を含むアダプターを検出装置にセットして、基質溶液展開用の液体を添加すればよい。この場合、図4のアダプターを交換すればよい。
- [0036] 本発明の検出装置は、上記フロースルー式検出装置のように、ハウジング内に収められていてもよく、該ハウジングにより、例えば紫外線や空気中の湿気による劣化

を防ぐことができる。例えば適当な大きさの樹脂製ケースをハウジングとして用い、該ケース中に本発明の装置を収納すればよい。また、捕捉試薬を固定化した固相支持体の表面を樹脂製フィルム等(トップラミネート)で覆ってもよい。

[0037] また、さらに被分析物質と前記標識試薬の混合物と捕捉試薬の反応時間を制御するための機能を有した部品を付加してもよい。被分析物質と前記標識試薬の混合物と捕捉試薬の反応時間の制御は、フロースルー式検出装置の場合、被分析物質と標識物質の混合物が捕捉試薬を固定化した固相支持体を横切って通過するのに要する時間、すなわち被分析物質と標識物質の混合物と捕捉試薬との接触時間を制御すればよく、またイムノクロマトグラフィー式検出装置の場合、被分析物質と標識物質の混合物が捕捉試薬を固定化した固相支持体に沿って展開移動するのに要する時間、すなわち被分析物質と標識物質の混合物と捕捉試薬との接触時間を制御すればよい。この時間の制御は被分析物質と標識物質の混合物を含む液体の流速を制御することにより達成できる。フロースルー式検出装置またはイムノクロマトグラフィー式検出装置の一部に流速を減じるような部分を設ければ、被分析物質と標識物質の混合物と捕捉試薬との接触時間が長くなり、より高感度で検出し得る。例えば、固相支持体の上流に孔径の小さい多孔質材料でできた層または部位を設ければよい。また、フロースルー式検出装置またはイムノクロマトグラフィー式検出装置の一部に流速を増加させるような部分を設ければ、被分析物質と標識物質の混合物と捕捉試薬との接触時間が短くなり、より迅速に検出し得る。例えば、固相支持体の下流に液体を吸収する吸収部位を設ければよい。これらの部品により、自動的に反応時間を必要最小限に設定することが可能となり、簡便且つ感度・特異性の優れたアッセイを実施できる。

[0038] 本発明の方法に用いる検出装置は、さらに、対照用試薬を含んでもよく、さらに検体添加部や吸収部を含んでもよい。対照用試薬は限定されないが、例えば標識試薬中のリガンドが結合する物質を用いることができる。対照用試薬は、フロースルー式検出法においては、膜上の捕捉試薬とは異なる部位に固定化すればよく、イムノクロマトグラフィー式検出法においては、捕捉試薬固定化部位の下流に固定化すればよい。検体添加部は、一旦検体と標識試薬の混合物を吸収し、次いで吸収し

た混合物を捕捉試薬が固定化された固相支持体に供給するための部分である。該検体添加部は、一定量の液体を吸収できるような多孔質材料でできていることが望ましく、例えば、ガラス繊維やポリスチレンでできた不織布を用いればよい。吸収部は、捕捉部を通過した検体を吸収することにより、検体の流れを制御する液体吸収性を有する部位である。フロースルー式検出法においては、例えば捕捉試薬を固定化した膜の下部に設ければよく、イムノクロマトグラフィー式検出法においては、検出装置の最下流に設ければよい。吸収部は例えば紙製のものをアブソーベントパッドとして用いればよい。

### 実施例

[0039] 本発明を以下の実施例によって具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。なお、以下の実施例中、従来より行われていた方法を比較例とした。

[0040] 実施例1 フロースルー式検出装置を用いたA型インフルエンザウイルスの検出

#### (1) 金コロイド抗体の調製

10mLの金コロイドを取り、100mM炭酸カリウムでpHを7.0に調整する。2mMホウ酸溶液で透析、遠心分離し精製した抗A型インフルエンザウイルスモノクローナル抗体を2mMホウ酸溶液で100  $\mu$ g/mLの濃度になるように調製する。調製した抗A型インフルエンザウイルスモノクローナル抗体の最終濃度が10  $\mu$ g/mLとなる量を十分攪拌させながら金コロイドに加える。5分後10%BSAを1mL加え、穏やかに10分間ローテーターで攪拌する。全量を遠心管に移し、14000rpm、30分、4°Cで遠心する。遠心後上清を吸引廃棄し、沈殿している金コロイドと抗A型インフルエンザウイルスモノクローナル抗体の感作されたものに、最終濃度が10mMトリス塩酸緩衝液、1%BSA、150mM塩化ナトリウムを含む溶液1mLで浮遊する。

[0041] (2) 金コロイド抗体の乾燥化

前項で作製した金コロイド抗体を陽圧噴霧装置 (BioDot社製、BioJet) を用いて8.0OD<sub>520</sub>、10  $\mu$  L/cmの速度、及び量で10mmx300mmのポリスチレン不織布に噴霧する。次いで減圧装置内で1時間減圧乾燥し、乾燥金コロイド抗体パッドとした。使用時には7mm間隔で裁断し、用いた。

[0042] (3) 診断用メンブレンフィルターへの抗体の固定化、検出装置の作製

ニトロセルロースフィルターへの抗インフルエンザウイルスモノクローナル抗体(マウス)の固定化を例に説明する。

[0043] プロテインAカラムでアフィニティー精製した抗インフルエンザウイルスモノクローナル抗体(マウス)を用意する。抗体が浮遊されている緩衝液をSephadex G-25ゲル濾過カラムを用いて0.1%トレハロース加10mMクエン酸緩衝液(pH4.0)に置き換える。

[0044] 280nmでの吸光度が1.0となるように0.1%トレハロース加10mMクエン酸緩衝液(pH4.0)で希釈し、適量を(例えばフロースルー検出(診断)装置の場合10  $\mu$  L/装置(デバイス)となるように)検出装置に装着したニトロセルロース上に滴下、次いで45°C、40分間静置、乾燥する。

[0045] (4) 検出方法(比較例としての従来法)

A型インフルエンザウイルスを含むと思われるサンプルを適当な緩衝液に浮遊させる。その溶液500  $\mu$  Lと金コロイド抗体8.0OD<sub>520</sub>、50  $\mu$  Lを混合し反応させる。一定時間反応後、フィルター(例えば、0.22  $\mu$  m)で濾過した後、検出装置(デバイス)へ全量滴下する。液が膜部材に全て吸収された後、抗インフルエンザウイルスモノクローナル抗体を吸着させた部分の膜部材が金コロイドの色(例えば、赤色ー赤褐色)に着色していれば、サンプル中にA型インフルエンザウイルスが存在していると確認される。色調の変化がなく膜部材の色のままであれば、サンプル中にA型インフルエンザウイルスが存在していないことになる。

[0046] (5) 検出方法ー1(デバイス側に検出試薬を組み込む場合)

(2)で作製したパッドを予め検出装置(デバイス)のアダプター上に、試験領域及びサンプルの吸収領域を遮らないよう、且つ外れないように組み込んでおき(図4B)、ここにA型インフルエンザウイルスを含むと思われるサンプル500  $\mu$  Lを試料濾過フィルターで濾過して全量滴下する。液が膜部材に全て吸収された後、抗インフルエンザウイルスモノクローナル抗体を吸着させた部分の膜部材が金コロイドの色(例えば、赤色ー赤褐色)に着色していれば、サンプル中にA型インフルエンザウイルスが存在していると確認される。色調の変化がなく膜部材の色のままであれば、サンプル中にA型インフルエンザウイルスが存在していないことになる。

[0047] (6)検出方法-2(試料濾過フィルター側に検出試薬を組み込む場合)

(2)で作製したパッドを予め試料濾過フィルター内部に外れないように組み込んでおき(図3)、これをA型インフルエンザウイルスを含むと思われるサンプル500  $\mu$  Lの入った容器に装着する。これを転倒混和し、乾燥金コロイド抗体とサンプルを容器内で十分に混合した後にデバイスに全量滴下する。液が膜部材に全て吸収された後、抗インフルエンザウイルスモノクローナル抗体を吸着させた部分の膜部材が金コロイドの色(例えば、赤色ー赤褐色)に着色していれば、サンプル中にA型インフルエンザウイルスが存在していると確認される。色調の変化がなく膜部材の色のままであれば、サンプル中にA型インフルエンザウイルスが存在していないことになる。

[0048] 実施例2 イムノクロマトグラフィー(ラテラルフロー)式装置を用いたA型インフルエンザウイルスの検出

(1)金コロイド抗体の調製

10mLの金コロイドを取り、100mM炭酸カリウムでpHを7.0に調整する。2mMホウ酸溶液で透析、遠心分離し精製した抗A型インフルエンザウイルスモノクローナル抗体を2mMホウ酸溶液で100  $\mu$  g/mLの濃度になるように調製する。調製した抗A型インフルエンザウイルスモノクローナル抗体の最終濃度が10  $\mu$  g/mLとなる量を十分攪拌させながら金コロイドに加える。5分後10%BSAを1mL加え、穏やかに10分間ローテーターで攪拌する。全量を遠心管に移し、14000rpm、30分、4°Cで遠心する。遠心後上清を吸引廃棄し、沈殿している金コロイドと抗A型インフルエンザウイルスモノクローナル抗体の感作されたものに、最終濃度が10mMトリス塩酸緩衝液、1%BSA、150mM塩化ナトリウムを含む溶液1mLで浮遊する。

[0049] (2)金コロイド抗体の乾燥化

前項で作製した金コロイド抗体を陽圧噴霧装置(BioDot社製、BioJet)を用いて6.0OD<sub>520</sub>、10  $\mu$  L/cmの速度、及び量で10mmx300mmのポリスチレン不織布に噴霧する。次いで減圧装置内で1時間減圧乾燥し、乾燥金コロイド抗体パッドとした。使用時には5mm間隔で裁断し、用いた。

[0050] (3)イムノクロマトグラフィー式装置の製作

A型インフルエンザウイルスを検出する膜部材上に抗インフルエンザウイルスモノク

ローナル抗体をごく少量(約 $2\mu\text{L}$ )滴下し、一定時間(例えば、10分ー60分)放置し膜部材に吸着させる。

[0051] (4) 検出方法

A型インフルエンザウイルスを含むと思われるサンプルを適当な緩衝液に浮遊させる。その溶液 $200\mu\text{L}$ と金コロイド抗体 $1.0\text{OD}_{520}$ 、 $30\mu\text{L}$ を混合し反応させる。一定時間反応後フィルター(例えば、 $0.22\mu\text{m}$ )で濾過した後、パッド(検体添加部位)へ全量滴下する。液が膜部材を展開し、抗インフルエンザウイルスモノクローナル抗体を吸着させた部分の膜部材が金コロイドの色(例えば、赤色ー赤褐色)に着色していれば、サンプル中にA型インフルエンザウイルスが存在していたと確認される。色調の変化がなく膜部材の色のままであれば、サンプル中にA型インフルエンザウイルスが存在していないことになる。

[0052] (5) 検出方法ー1 (試料濾過フィルター側に検出試薬を組み込む場合)

(2)で作製したパッドを予め試料濾過フィルター内部に外れないように組み込んでおき(図3)、これをA型インフルエンザウイルスを含むと思われるサンプル $200\mu\text{L}$ の入った容器に装着する。これを転倒混和し、乾燥金コロイド抗体とサンプルを容器内で十分に混合した後にイムノクロマトグラフィー式装置に全量滴下する。液が膜部材を展開し、抗インフルエンザウイルスモノクローナル抗体を吸着させた部分の膜部材が金コロイドの色(例えば、赤色ー赤褐色)に着色していれば、サンプル中にA型インフルエンザウイルスが存在していたと確認される。色調の変化がなく膜部材の色のままであれば、サンプル中にA型インフルエンザウイルスが存在していないことになる。

[0053] アッセイ操作および結果

[表1]



フロースルー型検出装置を用いた A 型インフルエンザウイルスの検出

	改良前（比較例）	改良後-1	改良後-2
アッセイ操作	①金コロイド抗体液を用意する ②金コロイド抗体液とサンプル液を混合する。 ③試料濾過フィルターを装着する。 ④試料をデバイスに滴下する。 ⑤吸収するまで室温で静置する。 ⑥判定	①試料濾過フィルターを含むアダプター（図 4 B）を装着する。 ②試料をデバイスに滴下する（デバイスに金コロイド抗体パッドが組み込まれている）。 ③吸収するまで室温で静置する。 ④判定	①試料濾過フィルターを装着する（フィルター内部に金コロイド抗体パッドが組み込まれている（図 3））。 ②試料をデバイスに滴下する。 ③吸収するまで室温で静置する。 ④判定
操作ステップ数	6 ステップ	4 ステップ	4 ステップ
試験結果	判定	判定	判定
強陽性検体	+++	+++	+++
弱陽性検体	+	+	+
陰性検体	—	—	—

[表2]

イムノクロマトグラフィー式検出装置を用いた A 型インフルエンザウイルスの検出

	改良前（比較例）	改良後
アッセイ操作	①金コロイド抗体液を用意する  ②金コロイド抗体液とサンプル液を混合する。  ③試料濾過フィルターを装着する。  ④試料をデバイスに滴下する。  ⑤吸収するまで室温で静置する。  ⑥判定	①試料濾過フィルターを装着する（フィルター内部に金コロイド抗体パッドが組み込まれている（図 3））。  ②試料をデバイスに滴下する。  ③吸収するまで室温で静置する。  ④判定
操作ステップ数	6 ステップ	4 ステップ
試験結果	判定	判定
強陽性検体	+++	+++
弱陽性検体	+	+
陰性検体	—	—

[0054] 本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

## 請求の範囲

- [1] 検体中の被分析物質を検出する方法であって、被分析物質に特異的に結合するリガンドを含む標識試薬と検体とを接触させる工程および検体と標識試薬との混合物を、前記被分析物質に特異的に結合する捕捉試薬を固定化した固相支持体へ供給する工程を含み、検体と標識試薬を接触させる工程が、前記固相支持体と分離した部位で行われる、前記被分析物質を検出する方法。
- [2] 被分析物質に特異的に結合するリガンドを含む標識試薬と検体とを接触させる工程および被分析物質と標識試薬との混合物を、前記被分析物質に特異的に結合する捕捉試薬を固定化した固相支持体へ供給する工程が一工程で行われることを特徴とする、請求項1記載の被分析物質を検出する方法。
- [3] さらに、不純物を除去する濾過工程を含み、被分析物質に特異的に結合するリガンドを含む標識試薬と検体とを接触させる工程、不純物を除去する濾過工程および被分析物質と標識試薬との混合物を、前記被分析物質に特異的に結合する捕捉試薬を固定化した固相支持体へ供給する工程が一工程で行われることを特徴とする、請求項2記載の被分析物質を検出する方法。
- [4] フロースルー式検出法である、請求項1から3のいずれか1項に記載の方法。
- [5] イムノクロマトグラフィー式検出法である、請求項1から3のいずれか1項に記載の方法。
- [6] 被分析物質に特異的に結合するリガンドを含む標識試薬と検体との接触が、標識試薬を含む検体添加用デバイス中で行われる、請求項1から5のいずれか1項に記載の方法。
- [7] 検体添加用デバイス中に濾過手段が含まれる請求項6記載の方法。
- [8] 標識試薬が濾過手段中に含まれる請求項7記載の方法。
- [9] 被分析物質に特異的に結合するリガンドを含む標識試薬を含む多孔質材料が、捕捉試薬を固定化した固相支持体の上層に設置し得るアダプター中に含まれており、検体をアダプター中に添加することにより、被分析物質に特異的に結合するリガンドを含む標識試薬と検体とを接触させ、次いで検体と標識試薬との混合物を、前記被分析物質に特異的に結合する捕捉試薬を固定化した固相支持体へ供給することを

- 含む、フロースルー式検出法である請求項1に記載の方法。
- [10] 標識試薬が不溶性粒状物質、酵素、蛍光色素および放射性同位体からなる群から選択される物質で標識されている請求項1から9のいずれか1項に記載の方法。
- [11] 標識試薬が酵素で標識されており、さらに該酵素の基質を供給する工程を含む請求項10に記載の方法。
- [12] 被分析物質が抗原であり、かつリガンド及び捕捉試薬が前記抗原に特異的に結合する抗体である、請求項1から11のいずれか1項に記載の方法。
- [13] 被分析物質が抗体であり、かつリガンド及び捕捉試薬が前記抗体が特異的に結合する抗原である、請求項1から11のいずれか1項に記載の方法。
- [14] 固相支持体が、ニトロセルロース、酢酸セルロース、ナイロン、ポリエーテルスルホン、ポリビニルアルコール、ポリエステル、ガラス繊維、ポリオレフィン、セルロース、およびこれらの混合繊維からなる人工ポリマーからなる群から選択される請求項1から13のいずれか1項に記載の方法。
- [15] 検体中の被分析物質に特異的に結合する捕捉試薬を固定化した固相支持体を含む検出装置及び被分析物質に特異的に結合するリガンドを含む標識試薬を含む検体添加用デバイスを含む、検体中の被分析物質検出用キット。
- [16] さらに、被分析物質に特異的に結合するリガンドを含む標識試薬を含む検体添加用デバイス中で接触した検体と標識試薬との混合物を濾過する手段を含む請求項15記載のキット。
- [17] 検体添加用デバイスが、濾過手段を含む請求項16記載のキット。
- [18] 濾過手段が、標識試薬を含む請求項17記載のキット。
- [19] フロースルー式検出キットである、請求項15から18のいずれか1項に記載のキット。
- [20] イムノクロマトグラフィー式検出キットである、請求項15から18のいずれか1項に記載のキット。
- [21] 標識試薬が不溶性粒状物質、酵素、蛍光色素および放射性同位体からなる群から選択される物質で標識されている請求項15から20のいずれか1項に記載のキット。
- [22] 標識試薬が酵素であり、さらに該酵素の基質を供給する手段を含む請求項21記載

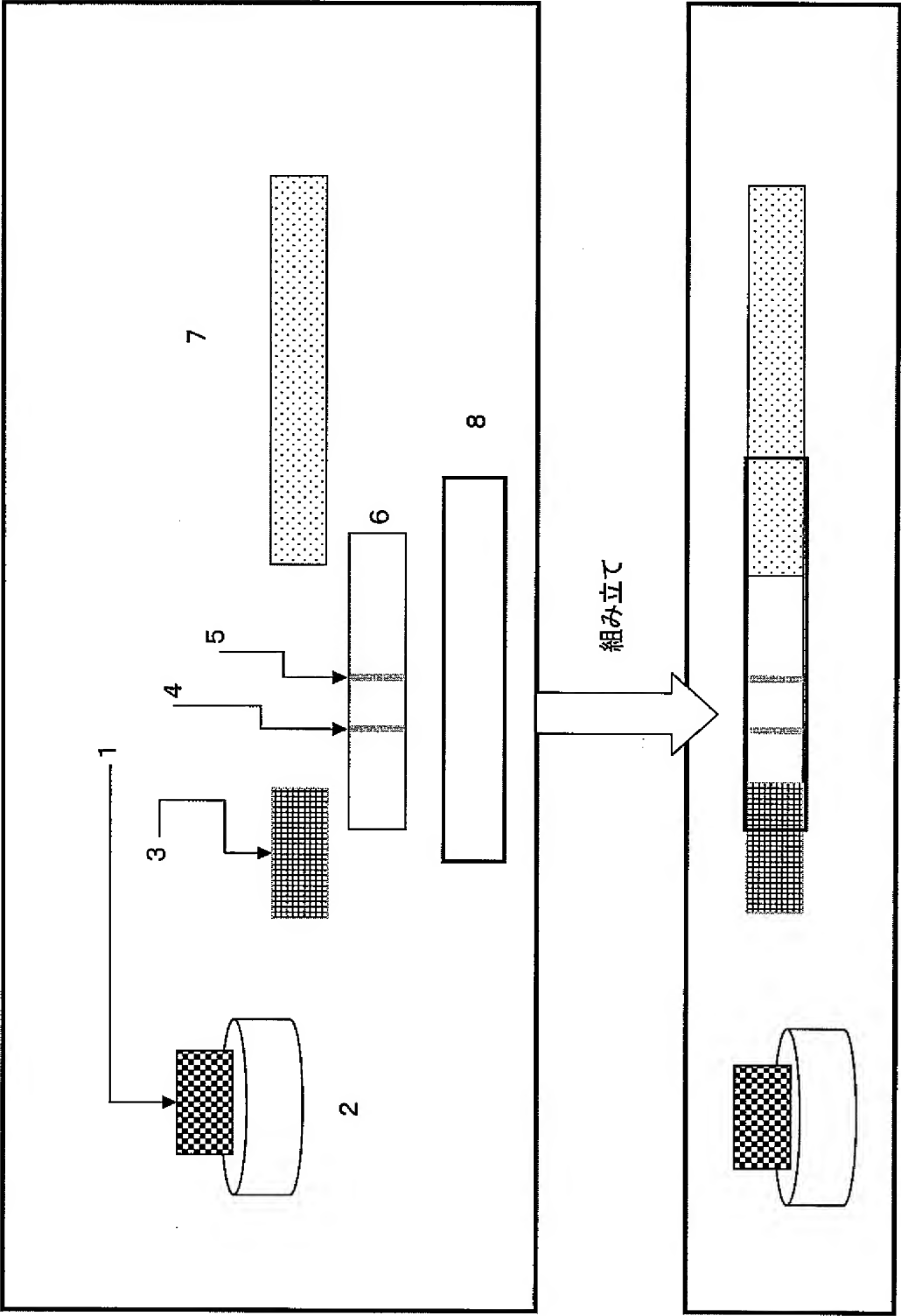
のキット。

- [23] 被分析物質が抗原であり、かつリガンド及び捕捉試薬が前記抗原に特異的に結合する抗体である、請求項15から22のいずれか1項に記載のキット。
- [24] 被分析物質が抗体であり、かつリガンド及び捕捉試薬が前記抗体が特異的に結合する抗原である、請求項15から22のいずれか1項に記載のキット。
- [25] 固相支持体が、ニトロセルロース、酢酸セルロース、ナイロン、ポリエーテルスルホン、ポリビニルアルコール、ポリエステル、ガラス繊維、ポリオレフィン、セルロース、およびこれらの混合繊維からなる人工ポリマーからなる群から選択される請求項15から24のいずれか1項に記載のキット。
- [26] 検体中の被分析物質に特異的に結合する捕捉試薬を固定化した固相支持体および被分析物質に特異的に結合するリガンドを含む標識試薬を含む多孔質材料を含むフロースルー式検出装置であって、前記多孔質材料が前記固相支持体の上層に位置するアダプター中に含まれる被分析物質検出装置。
- [27] 標識試薬が不溶性粒状物質、酵素、蛍光色素および放射性同位体からなる群から選択される物質で標識されている請求項26記載の被分析物質検出装置。
- [28] 被分析物質が抗原であり、かつリガンド及び捕捉試薬が前記抗原に特異的に結合する抗体である、請求項26または27に記載の被分析物質検出装置。
- [29] 被分析物質が抗体であり、かつリガンド及び捕捉試薬が前記抗体が特異的に結合する抗原である、請求項26または27に記載の被分析物質検出装置。
- [30] 固相支持体が、ニトロセルロース、酢酸セルロース、ナイロン、ポリエーテルスルホン、ポリビニルアルコール、ポリエステル、ガラス繊維、ポリオレフィン、セルロース、およびこれらの混合繊維からなる人工ポリマーからなる群から選択される請求項26から29のいずれか1項に記載の被分析物質検出装置。
- [31] 検体を収納する容器部分および検体を検体中の被分析物質検出装置に供給するためのノズル部分を含む、検体中の被分析物の検出に用いられる検体添加用デバイスであって、ノズル部分に検体濾過手段および検体中の被分析物質と複合体を形成し得る標識試薬が組み込まれた、検体添加用デバイス。
- [32] 標識試薬が不溶性粒状物質、酵素、蛍光色素および放射性同位体からなる群から

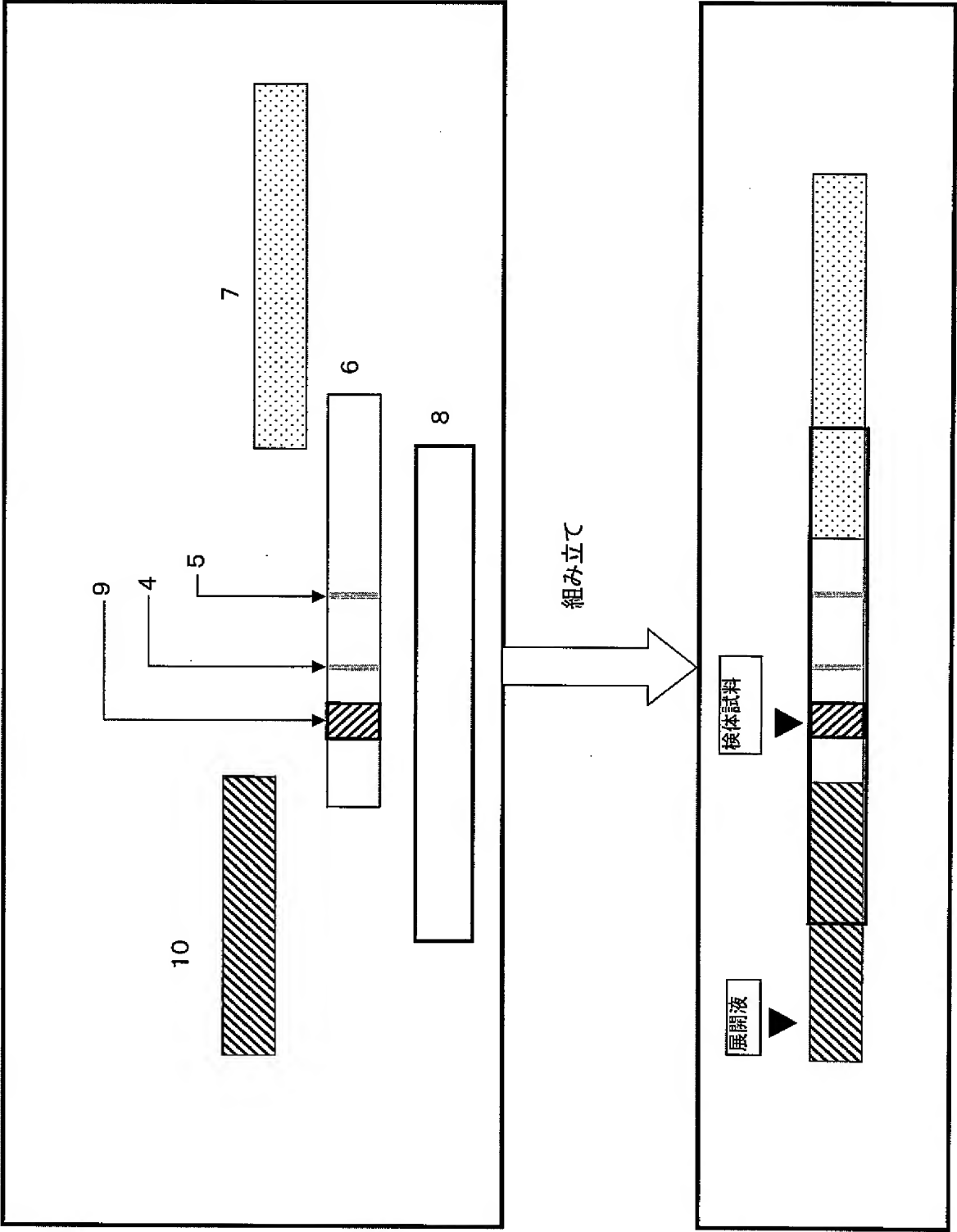
選択される物質で標識されている請求項31記載の検体添加用デバイス。

- [33] 検体濾過手段がフィルターである請求項31または32に記載の検体添加用デバイス。

[図1]

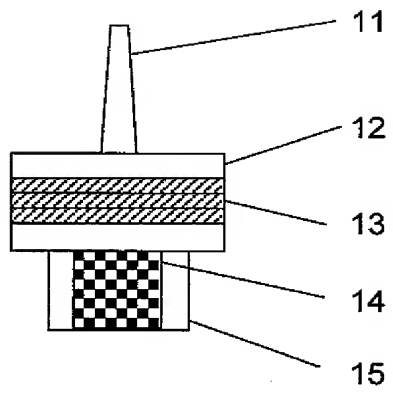


[図2]

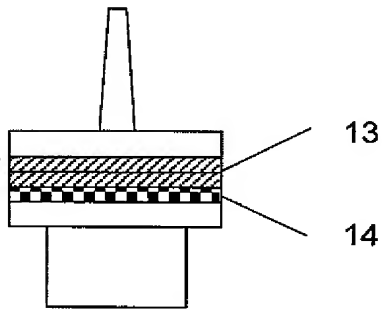




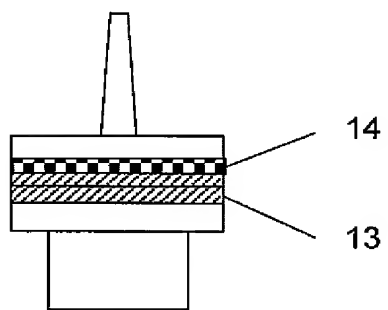
[図3A]



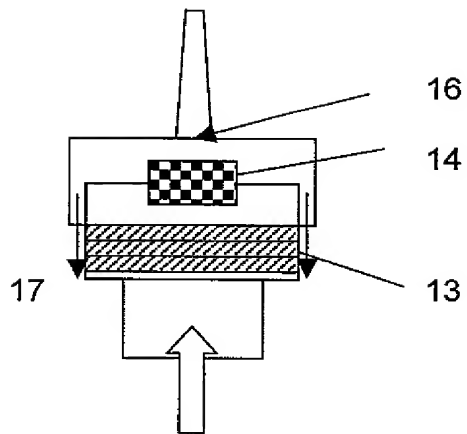
[図3B]



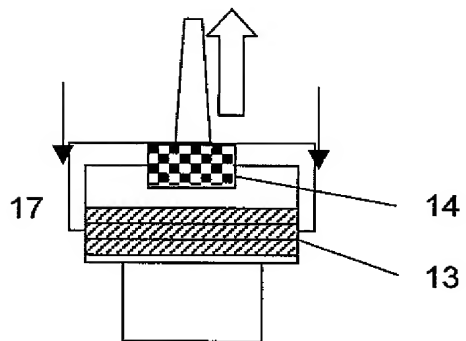
[図3C]



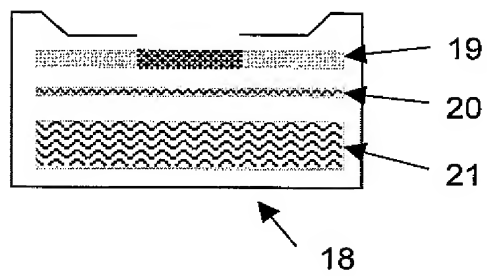
[図3D]



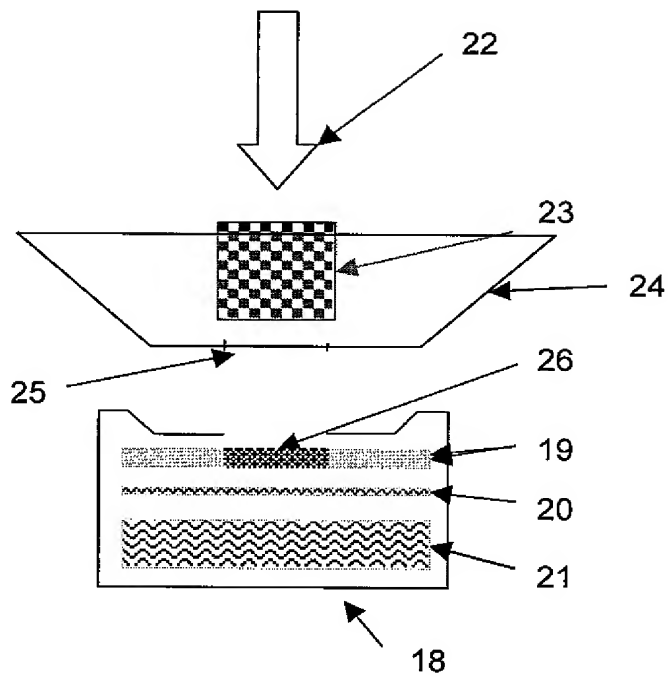
[図3E]



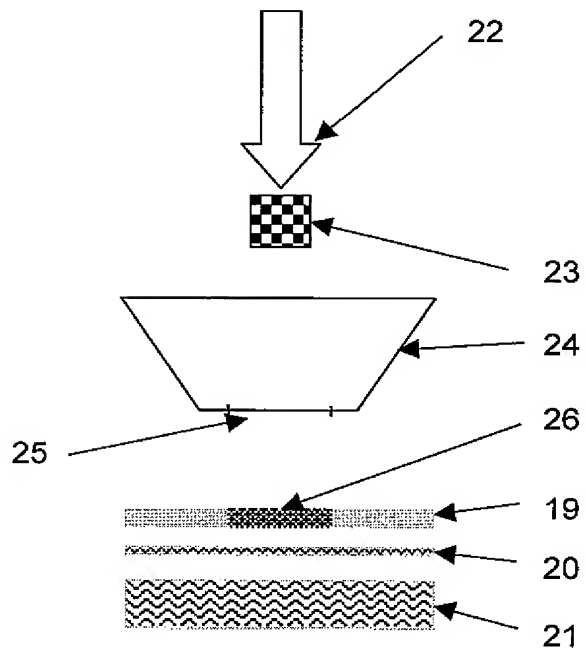
[図4A]



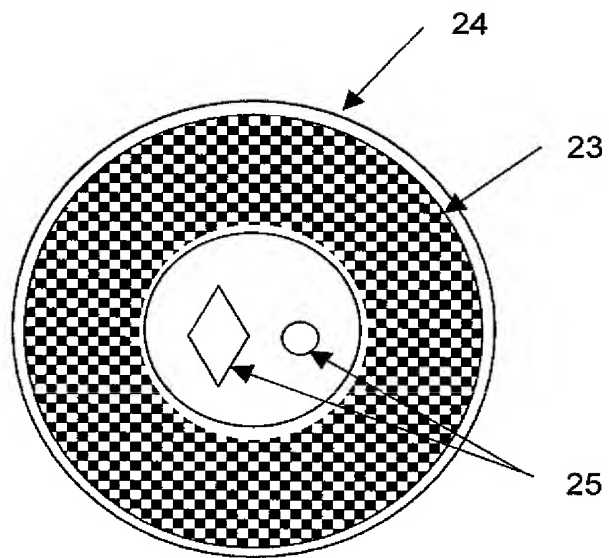
[図4B]



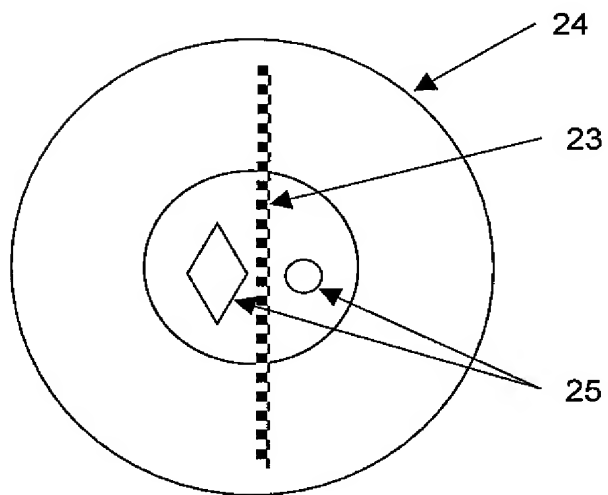
[図4C]



[図4D]



[図4E]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/001090

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.<sup>7</sup> G01N33/543, 33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.<sup>7</sup> G01N33/543, 33/53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2005
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2005	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2003/016902 A (PROTEOME SYSTEMS INTELLECTUAL PROPERTY PTY LTD.),	1-4, 6, 7, 10,
Y	27 February, 2003 (27.02.03),	12-14
	& EP 1419387 A & AU 2002331408 A	8, 18, 19,
	& JP 2004-538488 A	26-33
X	JP 2003-511697 A (CONNEX GESELLSCHAFT ZUR OPTIMIERUNG VON FORSCHUNG UND ENTWICKLUNG MBH.),	1-3, 5-7, 9,
Y	25 March, 2003 (25.03.03),	12-17, 20,
	& WO 2001/027612 A & EP 1221045 A	23-25
		8, 18, 19,
		26-33



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
26 April, 2005 (26.04.05)Date of mailing of the international search report  
17 May, 2005 (17.05.05)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/001090

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 2001-33453 A (Eiken Chemical Co., Ltd.), 09 February, 2001 (09.02.01), (Family: none)	1-3, 5-7, 10-17, 20-25 8, 18, 19, 26-33

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.<sup>7</sup> G01N33/543, 33/53

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.<sup>7</sup> G01N33/543, 33/53

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2005年
日本国実用新案登録公報	1996-2005年
日本国登録実用新案公報	1994-2005年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 2003/016902 A (PROTEOME SYSTEMS INTELLECTUAL PROPERTY PTY LTD) 2003. 02. 27	1-4, 6, 7, 10, 12-14
Y	& EP 1419387 A & AU 2002331408 A & JP 2004-538488 A	8, 18, 19, 26-33

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献  
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

26. 04. 2005

国際調査報告の発送日

17. 5. 2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

宮澤 浩

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

2J

9407

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 2003-511697 A(コンネクス・ゲゼルシャフト・ツーア・オブティ ミエリング・フォン・フォルシュング・ウント・エントヴィックル ング・エムペーハー)2003.03.25 & WO 2001/027612 A & EP 1221045 A	1-3, 5-7, 9, 12-17, 20, 23-25 8, 18, 19, 26-33
Y		
X	JP 2001- 33453 A(栄研化学株式会社)2001.02.09 (ファミリーなし)	1-3, 5-7, 10-17, 20-25 8, 18, 19, 26-33
Y		